

牛体外受精における精子処理法 の簡略化に関する研究

小林 真・古賀 満*・岡田 育穂
(動物生産生理学研究室)
平成7年11月20日 受理

A Simplified Method for Sperm Manipulation in Bovine *In Vitro* Fertilization

Shin KOBAYASHI, Mitsuru KOGA and Ikuo OKADA
(Laboratory of Animal Reproductive Physiology)

Received November 20, 1995

Summary

This study was undertaken to establish a simplified method for sperm manipulation in *in vitro* fertilization (IVF) in bovine. The object of experiment 1 was to determine the necessity of a preincubation procedure for sperm in order to attain capacitation. In experiment 2, the optimum number of centrifugations and resuspensions for sperm washing were examined. In experiment 3, the effect of the concentration of spermatozoa in IVF was investigated.

The results indicated that preincubation was apparently unnecessary for capacitation of sperm, and one sperm washing was sufficient for IVF. A simple technique whereby sperm were centrifuged in freezing straw was highly successful in IVF. A decrease in sperm concentration reduced the percentage of fertilization and subsequent development of oocytes. Regression equations of cleaved oocyte rate at the 3rd day after insemination and of morula-blastocyst rate at the 7th day on sperm concentration were $Y = -147.22 + 30.14X$ ($P < .01$) and $Y = -79.2 + 15.93X$ ($P < .01$), respectively.

Key words: IVF in bovine, Sperm, Simplified technique

緒 言

哺乳動物の体外受精に関する研究は近年極めて盛んであって、技術改良に関しては著しい進歩がみられる¹⁾。特に牛については、実験的段階から実用段階に進みつつあるのが現状であるが、それでもまだ多くの解決すべき課題が残っている²⁾。

体外受精は卵子と精子を *in vitro* の条件で受精させ、胚を一定の水準まで発育させる技術であるから、高水準の成果を得るためには、卵子の操作のみならず、精子処理に関しても十分な技術水準に達していなければならない。牛の体外受精に供試する精子は市販の凍結精液を用い、

* 現在伊藤ハム株式会社九州事業部、佐賀県三養基郡基山町長野970-1, 〒841-02

凍結精液ストローの温湯による融解、希釈と遠沈による洗浄、受精能付加操作、精子数の調整を行った後、受精培地に適量の精子浮遊液を添加する。この基本的な流れはどの報告においてもほぼ一致しているが、個々の操作内容に関しては相当の違いがある。精子の遠沈洗浄に関しては、遠沈の重力は200-2000 g^{3,4)}、遠沈時間に関しては5-10分^{3,5,7)}、遠沈の繰り返し回数は1-4^{3,6,7)}と報告により違いがみられる。精子に対する受精能付加操作は、カフェインやヘパリン等の薬剤を受精培地に加えて誘起させるのが一般的であるが、受精能付加のための精子前培養時間は非常に様々であって、15分から5時間まで報告されている^{3,6,8-10)}。また、最近では、全く前培養を行わない報告も多くなっているが¹⁰⁻¹³⁾、受精能獲得能力が低い精子に対しては前培養が必要との報告もある¹⁰⁾。すなわち、この点に関しては見解がまだ一致していないと考えられる。また、受精培地の精子濃度については、報告により $5 \times 10^5/\text{ml}$ - $18 \times 10^6/\text{ml}$ の幅がある^{3,5,14,15)}。このように個々の操作技術に関して違いが大きい理由として、受精能獲得能力の個体差¹⁶⁻¹⁸⁾の問題があり、同じ処理方法で対応できず、種雄牛個々に対処せざるをえないことが挙げられる。すなわち、未だにどの種雄牛に対しても有効な普遍的な技術が開発されていないことが問題である²⁹⁾。

凍結融解精子は生存能力が低く、融解後は活力が急速に低下するので、精子は融解後出来るだけ速やかに受精培地に導入することが望ましい³⁾。しかしながら、現在一般的に行われている精子処理操作は複雑であり、時間を必要とし、場合によっては精液の融解から卵子への導入までに6時間近くも要することがある¹⁹⁾。このような場合、精子の運動性が著しく低下することも予想できる。

牛の凍結精液は高価であり、入手しにくい貴重なものも少なくない。従って、出来るだけ少ない精子を用い、効率的に受精させることが必要と思われる。

そこで、本研究においては、現在行われている各操作内容を単純化と簡略化の方向で再検討し、出来るだけ簡便で有効な精子処理方法を考案することと、効率的な体外受精に必要な最少の精子濃度を求めることを目的として計画された。

材料及び方法

供試牛精子：

本実験で使用した牛凍結精液は、1頭の黒毛和種種雄牛より採取されたものであり、佐賀県酪農業協同組合連合会より購入した。入手後直ちに -196°C の液体窒素容器に格納し、使用直前に 38.5°C の温湯中で融解した。精子処理に当たってはBO液²⁰⁾を基礎培地として用いた。

各実験における精子運動性の評価(活力)については、目測5段階法を用いた。精子浮遊液の5 μl のドロップを35mmプラスチックシャーレの中央部に2個作成し、直ちにミネラルオイル(Squibb)で覆って 37°C で1分間加温した。100倍の生物顕微鏡で全面にわたって観察し、視野中で、ほとんど全部の精子が活発な前進運動をしている場合を4、運動している精子の割合の低下に従って順次3、2、1とランキングし、ほとんど前進運動が見られないものについてはこれを0とした。

各実験における精子操作：

1) 実験1

実験1では精子の前培養処理の必要性を調べるために実施した。前培養時間を0、1、及び2時間の3区に分け、それぞれを、H0区、H1区及びH2区とした。

融解した精液を目盛り共栓付き10mlガラス製遠沈管に移し、精子洗浄液 (10mM カフェイン加BO液)を加え10mlとし軽く攪拌後、室温で700g, 7分間遠沈した。上清液を取り除き、同じ精子洗浄液を加え再度10mlとした。同様操作により遠沈を行い、沈澱分画約0.4mlについて精子数算定を行って $2 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した。この精子浮遊液に対して20mg/ml BSA (片山, Fraction V), $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリン加BO液で等量希釈後 (終濃度: 精子数 $10^7/\text{ml}$, BSA10mg/ml, カフェイン5.0mM, ヘパリン $10 \mu\text{g}/\text{ml}$), 直ちに活力検査を行った。H0区に関しては、そのまま100 μl のドロップを作成して受精培養を開始し、H1区とH2区については、それぞれ1と2時間、炭酸ガス培養装置 (5%炭酸ガス, 95%空気, 38.5°C, 98%湿度) 内に静置した。これら両区については前培養終了後に精子の活力を判定し、受精培養を開始した。実験1は6反復行った。

2) 実験2

実験2では精子の遠沈希釈による洗浄操作の簡略化を目的とした。凍結精液は融解後ストローから精子浮遊液を取り出さず、そのまま遠沈管に垂直に立てて1回だけ遠沈する区 (S1区)、実験1と同じ手順で遠沈洗浄を1回 (C1区) 及び2回 (C2区) 行う区の計3区を設定した。3区とも遠沈は室温で700g 7分間行った。S1区に関しては、遠沈後0.4mlの洗浄液中にストロー下部の沈澱物をストローもろともハサミで切り落とし、軽く攪拌して、精子を十分に浮遊させた後、ストロー片を取り出し精子数のカウントを行った。3区共に精子数を最終濃度 $10^7/\text{ml}$ に調整し、受精培養直前に活力検査を実施した。なお、実験1の結果から、精子前培養の必要はないと考えられたので、この操作は行わなかった。実験2についても6反復行った。

3) 実験3

実験3は受精培地における精子数と受精成績の関係を明らかにするために行った。

精子前培養は行わず、また、実験2の結果ではS1区が最も操作が簡便であり精子活力の低下が少なかったため、遠沈はストロー内で1回のみ行った。前述の方法により5.0mMヘパリン, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ カフェイン, 10mg BSA 加BO液で希釈し、精子数の濃度を $10^7/\text{ml}$, $10^6/\text{ml}$ 及び $10^5/\text{ml}$ に調整し、それぞれをC7区、C6区及びC5区とした。以上の3精子浮遊液は作成後直ちに活力検査し、100 μl のドロップを作って受精培地とした。実験3は4反復行った。

牛卵巢と卵子の採取及び成熟培養：

牛卵巢は、屠場 (佐賀県畜産公社) において、屠殺後直ちに採取し (黒毛和種, ホルスタイン種及びこれらのF₁)、約34°Cに保った抗生物質入り0.85%生理的食塩水に投入した。卵子は屠殺後5時間以内に卵巢表面の直径2-7mmの小卵胞より、19G注射針付き5mlディスプレイザブル注射筒を用いて卵胞液とともに吸引採取した。得られた卵子を5%の非働化牛胎児血清 (FCS, Sera-lab) を加えた Dulbecco's 磷酸緩衝食塩水 (日水) に入れ、実体顕微鏡下で毛細ピペットにより吸引・排出を繰り返して3-4回洗った。これらの卵子のうち、卵丘細胞が少なくとも卵子表面の2/3以上覆っている卵子のみを選択した。直径35mmプラスチックシャーレに成熟培地 (5% FCS 加25mM Hepes 緩衝 Earle 塩入り TCM199, Gibco) の100 μl ドロップを作製し、表面をミネラルオイルで覆った。これに各ドロップ当り20-30個の卵子を投入し、炭酸ガス培養装置内で約22時間培養した。これらの操作の大要は後藤²¹⁾の方法によった。

体外受精操作：

成熟培養終了後の卵子をヘパリン加BO液中でピペッティングにより2-3回洗浄した。その後、1精子ドロップ当たり20-25個の卵子を投入した。受精培養は炭酸ガス培養装置内で5時間

行った。受精培養終了後、発生培地 (10% FCS 加 TCM199) で3-4回洗浄した。この時、ピペッティングにより卵子の周囲に付着した精子を出来るだけ除去した。発生培地に20-30個/ドロップ (100 μ l) の卵子をドロップの中心に寄せて投入し、発生培養を開始した。受精培養を開始して、72時間後 (3日目) に1回目の分割検査と培地交換を行った。その際、シャーレの底面に付着した卵丘細胞の単層 (シート) は残したままで引き続いて培養した。その後、48時間毎に培地を交換し、9日目まで観察した。その際においても、シートはそのままとし、培養液のみを交換した。卵子の形態は実体顕微鏡下で培地交換毎に観察し、受精と発生成績は培養開始3日目の分割率、7日目の桑実胚と胚盤胞の合計発生率及び9日後の胚盤胞率をそれぞれ求めた。これらの操作の概要も後藤²¹⁾の方法によった。

統計処理：

精子活力評価値はその数値を、分割率及び発生率 (%) はアークサイン変換後1元配置分散分析法により処理の効果を検定し、有意な効果があった場合には、Duncan's new multiple range test により区間の平均値間差の有意性を検定した。実験3においては、精子濃度 (X) に対する3日目の分割率と7日目の桑実胚・胚盤胞率 (Y) の直線回帰式を求めた。

結果及び考察

屠場における卵巣採取は計16回実施し、ホルスタイン種63頭、黒毛和種106頭及びこれら両品種のF₁76頭、合計245頭から未成熟卵子を合計2,381個得た。成熟培養は大部分の場合、成熟培地中で卵丘細胞の活発な増殖とシャーレ底に良好なシートの形成が見られたことから成功したものと思われた。

実験1)

実験1におけるH0区の精子運動性評価値の平均値と標準偏差は 2.83 ± 0.61 であった。一方、前培養実施区では、1時間の前培養終了後には、急速に活力が低下し、H1区とH2区の平均値は1程度、あるいはそれ以下となった。このように、前培養後には、ほとんどの精子は運動を停止した状態であったが、なかには活発に前進運動するものも観察された。この割合は視野中精子のおよそ1-5%程度であった。受精能力を獲得した精子は頭部を強く左右に振る特有の運動挙動 (Hyperactivation) を示すといわれているが²²⁾、本実験で観察された運動精子はこの運動型に相当するものが多かった。

実験1の体外受精結果を表1に示した。3日目の分割率は各区とも60%程度で差がなかった。これらの値を従来の報告^{8,23,24)}と比較しても大差がなく、分割率に関しては、平均的な成績と考えられた。7日目の成績ではH2区がH0区よりも5.6%高くなっているが統計的に有意ではなかった。同様の傾向は9日目の成績でも観察されたが、区間に有意差はなかった。以上のように、前培養の有無による発生成績の差は有意ではないという結果が得られた。受精培地に対してヘパリンの添加、または、ヘパリンとカフェインの同時添加が受精能獲得を有効に誘導することについては、すでに多くの報告がある^{3,16,25)}。Parrish *et al.*³⁾ はヘパリン添加受精培地の場合、長時間の前培養はいたずらに精子活力を損耗するだけと述べて、前培養時間を15分程度に止めている。他の報告でも、前培養時間を短時間に限ったものが多い^{8,9,20)}。さらに、Tsuzuki *et al.*⁷⁾ は前培養をしない区と3時間実施した区の胚盤胞発生率には有意な区間差はみられないことを報告している。これらの結果から、通常の牛精液を供試する場合にはヘパリン添加培

Table 1. Influence of preincubation hours of sperm on percentages of cleavage at 3rd day, of morula and blastocyst at 7th day and of blastocyst at 9th day after insemination *in vitro*

Group	Hours of pre-incubation	Number of trials	Total number of oocytes	Percentage of oocytes cleaved at 3rd day after insemination	Percentage of morula and blastocyst at 7th day after insemination	Percentage of blastocyst at 9th day after insemination
H0	0	6	271	60.6±11.7 ¹⁾	26.3± 7.3 ¹⁾	6.7±5.3 ¹⁾
H1	1	6	284	60.3±11.2	27.2±10.9	8.1±4.5
H2	2	6	283	60.6± 5.5	31.9± 8.9	8.3±5.8

1) Mean±Standard deviation

地では、前培養をしなくても十分な精子の受精能力付加が起こるものと考えられる¹¹⁻¹³⁾。しかし、福田¹⁰⁾は、受精能獲得が困難な特性を持つ牛精子に対しては、短時間のCaイオノフォア処理精子、または、Caイオノフォア処理後ヘパリン添加培地に移した精子に対して3時間の前培養を行うことが卵子への侵入率を有意に上昇させたと報告している。また、受精能獲得を斉一な時間内に行わせるためには、3時間の前培養が有効とする報告もある¹⁴⁾。従って、精子の前培養の必要性は牛の個体または実験の目的により異なっていると考えられる。

実験 2)

実験2における精子運動性の観察結果を表2に示した。運動性評価値はストローのまま遠沈し、希釈洗浄のないS1区が最も高く、遠沈が2回、希釈洗浄が2回のC2区よりも有意に高くなった。この原因は、遠沈操作の物理的な力により、一部の精子が損傷を受けた可能性があること、さらには、処理時間経過による精子の損耗が考えられる。特にC2区は、両要因の効果が加算され、運動性の低下が強く現れたものであろう。

実験2の体外受精結果を表3に示した。3区とも分割率は66%以上であり、実験1の場合よりも若干高くなった。区間の差は最高値のC1区と最低値のC2区との間で3.8%であったが、これは有意ではなかった。7日目と9日目の発生成績はC1区が最も高くそれぞれ37.5%と12.8%であるが、他の区と有意差はなかった。S1区は融解した精子を洗浄していないので、グリセロールや卵黄等の凍結保護剤が受精培地に混入することは避けられない。しかし、ストロー内で濃縮された精子塊をBO液で精子数の調整を行うので、凍結保護剤の大部分はBO液

Table 2. Influence of repeated times of centrifuging and washing on motility of sperm estimated by the five levels method

Group	Repeated times of centrifuging	Repeated times of washing	Number of trials	Mean ± S.D.
S1	1	0	6	3.1 ± 0.2 ^a ¹⁾
C1	1	1	6	2.6 ± 0.4 ^{ab}
C2	2	2	6	2.3 ± 0.3 ^b

1) Mean ± Standard deviation

a,b: Values without same letters are significant difference under 5% level.

Table 3. Influence of repeated times of centrifuging and washing of thawed sperm suspension on percentages of oocyte cleaved at 3rd day, of morula and blastocyst at 7th day, and of blastocyst at 9th day after insemination *in vitro*

Group	Repeated times of centri-fu-zing	Repeated times of washing	Number of trials	Total number of oocytes	Percentage of oocytes cleaved at 3rd day after insemination	Percentage of morula and blastocyst at 7th day after insemination	Percentage of blastocyst at 9th day after insemination
S1	1	0	6	296	69.8 ± 8.5 ¹⁾	30.4 ± 8.8 ¹⁾	9.2 ± 3.3 ¹⁾
C1	1	1	6	304	70.0 ± 7.2	37.5 ± 9.6	12.8 ± 5.9
C2	2	2	6	283	66.2 ± 10.7	31.7 ± 5.8	10.6 ± 3.8

1) Mean ± Standard deviation

に置換され、受精培地中の同剤の濃度はストロー中濃度の100分の1以下と考えられる。従って、この程度では、受精にはほとんど影響がなかったと思われる。マウスの凍結精子を体外受精に供試する場合、融解後の精子の活力が低く、遠沈等による洗浄が極めて難しいことから精子をあらかじめ高濃度で凍結し、精子数調整希釈のみで受精培地としても受精率には差がなかったとの報告²⁶⁾があり、凍結保護剤の受精培地への混入は、低濃度であれば体外受精の成績には影響しないと思われる。遠沈操作において、精子洗浄に必要とする以上の重力と時間を精子に対して与えることは精子の活力低下を招くことは明かであるが、反面、重力と時間の不足は、活力の高い精子を取り逃がす可能性があり好ましくない。効率の良い精子の洗浄方法について今後の研究が必要と思われる。

実験 3)

実験 3 の結果を表 4 に示した。C 7 区では分割率が66.3%であって、実験 1, 2 の場合と大差がなかった。しかし、精子濃度が両実験の10分の1となったC 6 区では分割率はその半分以上に低下した。C 5 区はさらに低く 6 %程度の卵子が分割したにすぎなかった。この傾向は 7 日目、9 日目の成績にも反映しC 5 区は胚盤胞が全く発生しなかった。しかし、9 日目の胚盤胞発生率ではC 7 区とC 6 区の成績の差は有意ではなかった。

Table 4. Influence of concentration of sperms on percentages of cleavage at 3rd day, of morula and blastocyst at 7th day, and of blastocyst at 9th day after insemination *in vitro*

Group	Concentration of sperms per ml	Number of trials	Total number of oocytes	Percentage of oocytes cleaved at 3rd day after insemination	Percentage of morula and blastocyst at 7th day after insemination	Percentage of blastocyst at 9th day after insemination
C7	10 ⁷	4	150	66.3 ^a ± 9.3 ¹⁾	33.7 ^a ± 11.3 ¹⁾	6.6 ± 5.5 ¹⁾
C6	10 ⁶	4	156	28.6 ^b ± 8.4	13.6 ^b ± 7.6	4.8 ± 6.6
C5	10 ⁵	4	146	6.0 ^c ± 1.8	1.8 ± 2.2	0

1) Mean ± standard deviation

a,b,c: Values without same letters are significant difference under 5% level.

3日目の分割率、及び7日目の桑実胚・胚盤胞発生率(Y)の精子濃度(X)への回帰直線を図1に示した。それぞれの回帰式は $Y = -147.22 + 30.14X$ ($P < .01$) 及び $Y = -79.20 + 15.93X$ ($P < .01$) であった。この2直線から、3日目の分割率を60%以上に、7日目の桑実胚・胚盤胞率を30%以上に維持するためには、本実験の培養体系では $10^{6.9}$ /ml以上の精子濃度が必要なが示された。

塩谷ら²⁷⁾は精子濃度が 2.5×10^5 – 5.0×10^5 /mlでは、受精率は著しく悪くなるが、 5×10^6 以上の場合には受精率が90%以上の良好な成績を得ている。本実験の結果も、体外受精の精子濃度は分割率と発生率に影響を及ぼすことを示している。

牛の受精培養における精子濃度は、多くの報告では 10^7 – 12.5×10^6 /mlの範囲であるが^{19,28,29)}, 1.5×10^5 – 10^6 /mlのような低濃度の報告もある^{3,30,31)}。このような場合にはSwim up法により、運動性の高い精子のみを分画採取していることが多い。しかし、これらの実験結果を相互に比較してみると、受精率、分割率あるいは発生率等に大きな違いは認められない。出来るだけ少ない精子を供試して、良好な成績を得るためには、真に必要な精子濃度を決定することが重要であろう。この点に関しても、今後の研究が必要である。

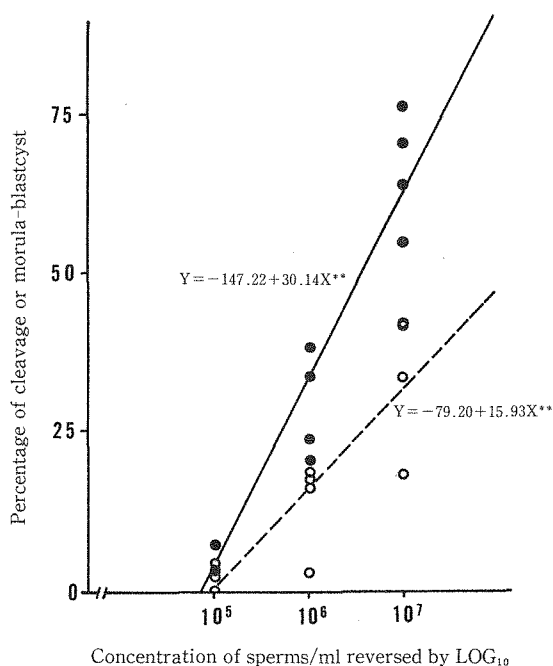


Fig. 1 Regression lines of percentage of oocyte cleaved at 3rd day, and of morula-blastocyst at 7th day after insemination *in vitro* on concentration of sperm in medium

- : Percentage of cleavage.
- : Percentage of morula-blastocyst.
- : Regression line of percentage of cleavage on sperm concentration.
- - - : Regression line of percentage of morula-blastocyst on sperm concentration.
- ** : Significant at $P = .01$.

要 約

本研究は牛の体外受精技術のうち、精子処理方法を簡略化する事を目的として計画された。実験1においては精子の受精能獲得の為の前培養の必要性を追究し、実験2においては、精子の遠沈と希釈の回数について、実験3では受精培地の精子濃度と体外受精成績について検討した。

本実験の結果から、精子の前培養処理は必要がないことが示された。また、遠沈洗浄の回数は1回で十分と考えられ、凍結用ストローのまま遠沈する方法が提案された。さらに、精子濃度の低下は、受精成績を低下させる事がわかった。3日目の分割率及び7日目の桑実胚・胚盤胞発生率(Y)の精子濃度(X)への回帰式は、それぞれ $Y = -147.22 + 30.14X$ ($P < .01$)及び $Y = -79.20 + 15.93X$ ($P < .01$)であった。

謝 辞

本実験における牛卵巣の採取にご協力頂いた佐賀県畜産公社並びに佐賀県食肉衛生検査所職員の方々に深く感謝します。

文 献

1. 金川弘司 (1994). 最近20年間に於ける畜産学の進歩. 家畜・家禽の繁殖に関する研究の動向. II. 繁殖の人為支配関係. 日畜会誌, (独)日本畜産学会創立70周年記念号, 22-27.
2. 後藤和文 (1993). ウシの体外受精, 組織培養, **19**, 197-201.
3. Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried-Rutledge, E. S. Crister, W. H. Eyestone, and N. L. First (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, **25**, 591-600.
4. 小西正人・板倉はつえ・青柳敬人 (1994). ウシ体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす卵丘細胞との共培養における合成培地へのグルコース添加の影響 (1994). *J. Repro. Dev.*, **40**, j59-j63.
5. 梶原 豊・後藤和文・小坂昭三・中西喜彦・小川清彦 (1987). 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. 日畜会誌, **33**, 173-180.
6. Niwa, K., O. Ohgoda and M. Yuhara (1988). Effect of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on in-vitro penetration of cattle oocytes. *Proc. 11th. Congr. Anim. Perod. A. I.*, **3**, 346-348.
7. Tsuzuki, Y., K. Ino, S. Kimura, N. M. Tanaka, Fujihara N. and Koga O. (1991). Effects of preincubation and insemination times of spermatozoa on the development of bovine oocytes fertilized in vitro. *AJAS*, **4**, 151-156.
8. 近松典子・浦川真実・福井豊・青柳敬人・小野斎 (1989). ウシ卵胞内卵の体外受精と初期発生におよぼす異なる卵子成熟方法と精子処理方法の影響. *Jpn. J. Anim. Repro.*, **35**, 154-157.
9. 塩谷康夫・平田統一・高田直和・塚本章夫 (1989). 体外受精における牛精子のヘパリン処理と無処理時の受精率と胚盤胞への発育率. 家畜繁殖学会講演要旨, 59.
10. 福田芳詔 (1992). 共培養によるウシ初期胚の発生—卵丘細胞との共培養. *J. Reprod. Dev.*, **38**, j157-j164.
11. Kim, J. H., K. Niwa, J. M. Lim and K. Okuda (1993). Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, **48**, 1320-1325.
12. Shamsuden, M., B. Larsson and H. Rodrigues-Martinez (1994). A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryo up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology*, **41**, 1033-1043.
13. Lim J. M., O. Okita, K. Okuda and K. Niwa (1994). Effects of fetal serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, **41**, 1091-1098.
14. 桃沢健二・福田芳詔. 卵細胞質が不均一なウシ卵母細胞の体外における成熟能と受精能 (1995). 日畜会報, **66**, 605-609.
15. Fukui, Y (1990). Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, **26**, 40-46.
16. K. Niwa and O. Ohgoda (1988). Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, **30**, 733-741.
17. Shi, D. S., K. H. Lu and I. Gordon (1990). Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology*, **33**, 324.
18. Parrish, J. J. (1991). Elements of Mammalian Fertilization, vol. II, Application of in vitro fertilization to domestic animals. Wasserman, P. M. (ed.), CRC Press, Florida, USA, p.111-132.
19. 福島護之・富永敬一郎・秦谷豊 (1989). ウシ精子受精能獲得におけるヘパリン及びカフェインの添加が受精率と発生率に及ぼす影響. 家畜繁殖学会講演要旨, 58.
20. Brakett, B. G. and G. Oliphant (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, **2**,

- 260-274.
21. 後藤和文 (1993), 生殖機能細胞の培養法 (菅原七郎・尾川昭三編), II. 卵子の培養法, 5. ウシ, 学会出版センター, 東京, p.78-98.
 22. 岡部勝・柳町隆造 (1992). 精子学 (毛利秀雄監修), 第9章 精子の受精能獲得, 東京大学出版会, 東京, p.152-164.
 23. Goto, K, Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa (1988). Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryo derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicle oocytes. *J. Repro. Fert.*, **83**, 753-758.
 24. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda (1990). Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, **41**, 114-119.
 25. 三瀬博也・朴春暉・奥田潔・丹羽皓二 (1989). ウシ体外成熟卵胞卵への精子侵入時期に及ぼすカフェインとヘパリンの影響. 家畜繁殖学会講演要旨, 57.
 26. 中瀧直巳・上田進・山内一也・横山峯介・竹島勉・豊田豊 (1994). 凍結マウス精子の体外受精技術系の開発—受精の場における凍結精子懸濁液の希釈倍率の検討—. *J. Repro. Dev.*, **a13**.
 27. 塩谷康夫・李炳律・平田統一 (1991). 牛体外受精時におけるヘパリン処理時の精子濃度が受精率および受精後の胚盤胞への発生に及ぼす影響. 第84回日本畜産学会大会発表要旨, 50.
 28. 下司雅也・米内美晴・花田博文・小宮山鉄朗・高橋正義 (1993). 発生培地への添加血清の種類が牛体外成熟・体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響. 日畜会誌, **64**, 480-483.
 29. 新田良平・加藤容子・角田幸雄 (1993). 牛体外受精卵の発生率に及ぼす培養液量と培養卵数の影響. 日畜会誌, **64**, 904-908.
 30. Younis, A. I., B. G. Brackett and R. A. Frayer-Hosken (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Research*, **23**, 189-201.
 31. Yang, X., S. Jiang, and R. H. Foote (1993). Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedure. *Mol. Repro. Dev.*, **34**, 94-100.